

Title	Expression of Costimulatory Molecules B7-1 (CD80) and B7-2 (CD86) on Human Hepatocellular Carcinoma
Author(s)	巽, 智秀
Citation	
Issue Date	
oaire:version	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/41636">https://hdl.handle.net/11094/41636</a>
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed</a> 大阪大学の博士論文について <a href="#">ご参照</a> ください。

*Osaka University Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏 名	巽 智 秀
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 1 4 4 8 7 号
学 位 授 与 年 月 日	平成11年3月25日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第4条第1項該当 医学系研究科内科系専攻
学 位 論 文 名	Expression of Costimulatory Molecules B7-1 (CD80) and B7-2 (CD86) on Human Hepatocellular Carcinoma (ヒト肝細胞癌における costimulatory molecule B7-1 (CD80) および B7-2 (CD86) の発現)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 堀 正二  (副査) 教 授 林 紀夫 教 授 門田 守人

## 論 文 内 容 の 要 旨

### 【目的】

抗原特異的なT細胞の活性化には、T細胞レセプターを介した抗原認識シグナルだけでは不十分で、抗原提示細胞上に発現するB7-1あるいはB7-2分子といった costimulatory molecule と、T細胞上のCD28との結合による costimulatory シグナルが必要であることが明らかとなってきた。この costimulatory シグナル非供与下にT細胞レセプターを介した抗原認識シグナルを与えられたT細胞は活性化されないだけでなく、不応答状態 (clonal anergy) に陥ることが示されている。近年これら costimulatory molecule の腫瘍免疫における役割が注目されており、B7-1強発現腫瘍細胞による腫瘍免疫の誘導が試みられている。

肝細胞癌 (HCC) に対する治療は、手術・肝動脈塞栓術 (TAE)・アルコール注入療法 (PEIT)・化学療法などによる集学的治療によってその予後は改善しつつあるが、依然ほとんどの症例で再発を認め、既存の治療法に加えより確実な肝細胞癌に対する新たな治療法が求められている。肝細胞癌におけるB7-1あるいはB7-2分子といった costimulatory molecule の発現と、B7-1遺伝子の遺伝子導入による腫瘍免疫の誘導に関する検討は未だなされていない。そこで本研究においては、ヒト肝癌細胞における costimulatory molecule であるB7-1 (CD80) 分子とB7-2 (CD86) 分子の発現を検討し、さらにヒトB7-1遺伝子導入肝癌細胞による細胞障害活性誘導能を検討した。

### 【方法ならびに成績】

今回の検討には7つの肝癌細胞株 (Hep3B, HepG2, Huh-6, Huh-7, HB611, PLC/PRF/5, KYN-3) を用いた。各肝癌細胞よりRNAを抽出し、RT-PCR法にてB7-1及びB7-2の発現を検討した。またリン酸緩衝液に肝癌細胞を溶解し抗ヒトB7-1抗体、抗ヒトB7-2抗体、抗HLA class I抗体と反応させ、flow cytometryを施行した。各分子の陽性細胞率を isotype control の抗体を用いてラベルした細胞を対照として検討した。これら分子の発現が、免疫を修飾するサイトカインによって誘導されるかどうかを検討するために interferon- $\alpha$ , interferon- $\gamma$ , interleukin-12を添加し、24時間後にB7-1及びB7-2の発現を flow cytometry によって評価した。

次にヒト肝癌細胞 Hep3B 細胞にヒトB7-1遺伝子を遺伝子導入し、B7-1強発現肝癌細胞を作製した。健常人よりリンパ球を採取し  $5 \times 10^6$  個のリンパ球と、 $1 \times 10^6$  個のマイトマイシンC処理をしたB7-1強発現肝癌細胞を用いてリンパ球腫瘍混合培養を施行し、14日目に親株肝癌細胞を標的にクロムリリース法にてリンパ球の細胞障害活性

を検討した。

RT-PCR法の結果、全ての肝癌細胞において messenger RNA レベルにおける B7-1 および B7-2 の発現が確認された。flow cytometry の結果、全ての肝癌細胞において B7-1 分子、B7-2 分子及び HLA class I 分子の発現がみられた。しかし、B7-1 分子及び B7-2 分子の陽性細胞率は全ての肝癌細胞にて低率で 10% 以下であった。一方、5 つの細胞株では HLA class I 分子の発現は 97% 以上発現しており、残りの 2 つの細胞株でも約 30% 程度発現しておりいずれの細胞でも B7-1 分子 B7-2 分子より HLA class I 分子の方が強発現していた。

B7-1 分子の発現は、ほとんど全ての肝癌細胞株において interferon- $\alpha$  刺激及び interferon- $\gamma$  刺激によって濃度依存性に発現増強を認めたが、B7-2 分子の発現は、一部の肝癌細胞株において濃度依存性に発現増強を認めたのみであった。しかし、いずれの発現の増強も抗原提示細胞上の発現と同程度まで強発現とはならなかった。interleukin-12 刺激では、いずれの肝癌細胞においても B7-1 及び B7-2 分子の発現は誘導されなかった。

B7-1 遺伝子をヒト肝癌細胞 Hep3B 細胞に遺伝子導入することで、B7-1 強発現肝癌細胞が作製された。これを用いたリンパ球腫瘍混合培養の結果、B7-1 強発現肝癌細胞によって誘導されたリンパ球は親株肝癌細胞に対して強い細胞障害活性を示したのに対し、親株肝癌細胞株で誘導されたリンパ球はほとんど細胞障害活性を示さなかった。この B7-1 強発現肝癌細胞によって誘導された細胞障害活性は HLA class I 抗体によって減弱したが、HLA class II 抗体によって変化がなかった。また Hep3B 細胞と HLA class I を全く共有しない Huh-7 細胞を標的とした場合には、B7-1 強発現 Hep3B 細胞によって誘導されたリンパ球は Huh-7 細胞に対して細胞障害活性を全く示さなかった。

#### 【総括】

ヒト肝癌細胞表面に B7-1 及び B7-2 の発現を認めたが、低発現であり、サイトカイン刺激によっても、抗原提示細胞上の各分子の発現と同程度までは増強されなかった。*in vitro* において、ヒト肝癌細胞に B7-1 遺伝子を導入し強発現させることにより、健康人の末梢血単核球から肝癌細胞上の HLA class I を認識する CD8 陽性 CTL 活性が誘導された。以上の結果は、B7-1 遺伝子を用いた肝細胞癌に対する免疫遺伝子治療の臨床応用への可能性を示唆するものであった。

### 論文審査の結果の要旨

抗原提示細胞上に発現する B7-1 あるいは B7-2 分子といった costimulatory molecule は、T 細胞上の CD28 との結合によって costimulatory シグナルを供与し、抗原特異的な T 細胞の活性化において重要な役割を果たしている。近年これら costimulatory molecule の腫瘍免疫における役割が注目されているが、肝細胞癌におけるこれら分子の発現と、B7-1 遺伝子の遺伝子導入による腫瘍免疫の誘導に関する検討は未だなされていない。

本論文では、ヒト肝細胞癌細胞表面における B7-1 及び B7-2 の発現に関して、ヒト肝癌細胞上のこれら分子は低発現であり、免疫を修飾するサイトカインの刺激によっても、professional な抗原提示細胞上の各分子の発現と同程度まで増強されないことを明らかにした。また *in vitro* の系において、ヒト肝癌細胞に B7-1 遺伝子を導入し強発現させることにより、健康人の末梢血単核球から肝癌細胞上の HLA class I を認識する CD8 陽性 CTL 活性が誘導されることを明らかにした。

本研究で得られた知見は、B7-1 遺伝子を用いた肝細胞癌に対する免疫遺伝子治療の臨床応用への、基礎的な論拠を提示するものと考えられる。

従って、本論文は、学位に値するものと認める。